

NO 10 55

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



11 Publication number: **0 386 229 B1**

12

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

- 49 Date of publication of patent specification: 23.03.94 51 Int. Cl.⁵: **C07H 21/00, //C12Q1/68**
- 21 Application number: 89910878.1
- 22 Date of filing: 21.09.89
- 86 International application number:
PCT/GB89/01114
- 87 International publication number:
WO 90/03382 (05.04.90 90/08)

54 SUPPORT-BOUND OLIGONUCLEOTIDES.

- | | |
|--|---|
| <p>30 Priority: 21.09.88 GB 8822228</p> <p>43 Date of publication of application:
12.09.90 Bulletin 90/37</p> <p>45 Publication of the grant of the patent:
23.03.94 Bulletin 94/12</p> <p>84 Designated Contracting States:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE</p> <p>56 References cited:
EP-A- 0 090 789
EP-A- 0 241 363
EP-A- 0 261 283
WO-A-85/01051
DE-A- 3 446 635</p> | <p>73 Proprietor: ISIS INNOVATION LIMITED
2 South Parks Road
Oxford OX1 3UB(GB)</p> <p>72 Inventor: SOUTHERN, Edwin, M.
12 Scholl Road
Kidlington
Oxford OX1 3QU(GB)
Inventor: MASKOS, Uwe
25 Wellington Square
Oxford OX1 2JH(GB)</p> <p>74 Representative: Pennant, Pyers et al
Stevens, Hewlett & Perkins
1 Serjeants' Inn
Fleet Street
London EC4Y 1LL (GB)</p> |
|--|---|

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid (Art. 99(1) European patent convention).

melting was very sharp again, with most of the oligonucleotides eluted in two 90 µl fractions at 48 °C.

These experiments suggest that the derivatised beads will be useful in the chromatographic separation of nucleic acids.

5 REFERENCES

1. Langdale J A and Malcolm A D (1985)
A rapid method of gene detection using DNA bound to Sephacryl. *Gene* 1985, 36(3), 201-210.
2. Seed, B (1982)
Diazotizable aniline cellulose paper for the coupling and hybridization of nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* 10, 1799 - 1810.
3. Allfrey and Inoue (1978)
Affinity chromatography of DNA-binding proteins on DNA covalently attached to solid supports. *Methods Cell Biol.* 17, 253 - 270.
4. Banemann, H; Westhoff, P and Herrmann G (1982)
Immobilisation of Denatured DNA to Macroporous Supports: 1 Efficiency of different coupling procedures. *Nucl. Acids Res.* 10, 7163-7180.
5. Astell C R and Smith M (1972)
Synthesis and Properties of Oligonucleotide-Cellulose Columns. *Biochemistry* 11, 4114-4120.
6. Gilham P.T., *Biochemistry*, 7, No 8, 1968, 2809-13.
7. Matteucci M D and Caruthers M H
J.Am. Chem.Soc. 1981, 103, 3185-3191.
8. Beaucage S L and Caruthers M H
Tetrahedron Letters, Vol 22, No.20, pp 1859-1862, 1981.
9. Adams S P et al, *J.Am. Chem.Soc.* 1983, 105, 661-663
10. Sproat D S and Brown D M
Nucleic Acids Research, Vol 13, No.8, 1985, 2979-2987.
11. Crea R. and Horn T, *Nucleic Acids Research*, 8,
No 10, 1980, 2331-48.
12. Andrus A. et al., *Tetrahedron letters*, Vol 29,
No. 8, pp 861-4, 1988.
13. Applied Biosystems User Bulletin, Issue No. 43, Oct 1 1987, "Methyl phosphonamidite reagents and the synthesis and purification of methyl phosphonate analogs of DNA".
14. Miller P.S. et al., *Nucleic Acids Research*, 11, pages 6225-6242, 1983.
15. Arnold L.J. and Berg R.P., *Molecular Biosystems Inc PCT Application WO 85/01051*.

Claims

1. A method of making a derivatised support suitable for oligo-nucleotide synthesis, which method comprises attaching a nucleoside reagent to a support carrying hydroxyl groups by a covalent phosphodiester link which is stable to conditions used for removing protective groups from oligonucleotide chains.
2. A method of preparing an oligonucleotide bound to a support by
 - a) attaching a nucleoside reagent to a support,
 - b) synthesising on the supported nucleoside an oligonucleotide chain including protecting groups, and
 - c) removing the protecting groups from the oligonucleotide chain,
 characterised in that the support carries hydroxyl groups, whereby in step a) the nucleoside becomes attached to the support by a covalent phosphodiester link which is stable to the conditions used in step c).
3. A method as claimed in claim 1 or claim 2, wherein the support is of porous glass or glass beads.
4. A method as claimed in any one of claims 1 to 3, wherein the support carries hydroxyalkyl groups.

- 20

30

- 35

40

45

50

55

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Nukleosidreagenz ein Nukleosid-3'-methylphosphonamidit ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, wobei Schritt c) die Entfernung von Schutzgruppen aus Phosphotriestergruppen und aus N-Atomen der Nukleotidbasen und aus der 5'-Stellung am letzten Nukleotid der Kette einschließt.
10. Derivatisierter Träger, geeignet zur Oligonukleotidsynthese, umfassend ein Nukleosid, gebunden an einen Träger mit Hilfe einer kovalenten Phosphodiesterbindung der Struktur -O-PY-O-, wobei Y ein geschütztes oder ungeschütztes Sauerstoffatom darstellt.
11. Derivatisierter Träger nach Anspruch 10, wobei der Träger poröses Glas oder Glaskugeln darstellt.
12. Trägergebundenes Oligonukleotid, wobei das Oligonukleotid an den Träger über eine endständige Phosphatgruppe durch eine kovalente Phosphodiesterbindung der Struktur -O-PO₂-O-(C_nH_{2n})- gebunden ist, wobei n > 3 ist.
13. Trägergebundenes Oligonukleotid nach Anspruch 12, wobei der Träger poröses Glas oder Glaskugeln darstellt.

Revendications

1. Procédé de fabrication d'un support dérivé, convenant pour la synthèse des oligonucléotides, lequel procédé comprend le fait de fixer un réactif nucléoside sur un support portant des groupes hydroxyle par une liaison phosphodiester covalente qui est stable dans les conditions utilisées pour éliminer les groupes protecteurs des chaînes d'oligonucléotides.
2. Procédé de préparation d'un oligonucléotide lié à un support.
 - a) en fixant un réactif nucléoside sur un support,
 - b) en préparant par synthèse sur le nucléotide sur support, une chaîne d'oligonucléotides contenant des groupes protecteurs, et
 - c) en éliminant les groupes protecteurs de la chaîne d'oligonucléotides,caractérisé en ce que le support porte des groupes hydroxyle, de sorte que dans l'étape a) le nucléoside se fixe sur le support par une liaison phosphodiester covalente qui est stable dans les conditions utilisées dans l'étape c).
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le support est du verre poreux ou des perles de verre.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le support porte des groupes hydroxyalkyle.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif nucléoside est un 3'-phosphoramidite de nucléoside.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif nucléoside est un 3'-phosphite nucléoside.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif nucléoside est un 3'-phosphonate ou un 3'-hydrogénophosphonate de nucléoside.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le réactif nucléoside est un 3'-méthylphosphonamidite de nucléoside.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendication 2 à 8, dans lequel l'étape c) comporte une élimination de groupes protecteurs de groupes phosphotriester et d'atomes N des bases de nucléotides ou de la position 5' sur le dernier nucléotide de la chaîne.

10. Support dérivé, convenant pour la synthèse des oligonucléotides, comprenant un nucléoside lié à un support au moyen d'une liaison phosphodiester covalente répondant à la formule -O-PY-O-, dans laquelle Y est un atome d'oxygène protégé ou non protégé.

5 11. Support dérivé selon la revendication 10, dans lequel le support est un verre poreux ou des perles de verre.

12. Oligonucléotide lié à un support dans lequel l'oligonucléotide est lié au support par l'intermédiaire d'un groupe phosphate terminal, par une liaison phosphodiester covalente répondant à la formule -O-PO₂-O-(C_nH_{2n})- où n est > 3.

10 13. Oligonucléotide lié à un support selon la revendication 12, dans lequel le support est un verre poreux ou des perles de verre.

15

20

25

30

35

40

45

50

55